

· 医学与免疫生物技术 ·

卡他莫拉菌 UspA1 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定

王辉, 杨波, 赵可胜, 李家吉, 李新, 孔萌萌, 官春杰, 王毅, 陶冶, 张秋, 胡征

湖北工业大学 生物工程与食品学院 发酵工程教育部重点实验室, 湖北 武汉 430068

王辉, 杨波, 赵可胜, 等. 卡他莫拉菌 UspA1 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(1): 102-109.

Wang H, Yang B, Zhao KS, et al. Preparation and identification of polyclonal antibodies against *Moraxella catarrhalis* UspA1. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 102-109.

摘 要: 为制备抗卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*, Mc) 表面蛋白 UspA1 胞外结构域的多克隆抗体 (PcAb), 对 UspA1 蛋白进行生物信息学分析, 获取胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段, 找到其对应的基因序列并引入大肠杆菌偏好性密码子, 对其优化后化学合成全基因序列。将该基因序列按常规方法克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组 UspA1-His 融合蛋白并纯化。以该纯化抗原免疫新西兰大白兔, 经 4 次免疫后, 用 Protein A 亲和层析柱从抗血清中纯化出抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb IgG。经免疫荧光法、酶联免疫吸附法及 Western blotting 鉴定, 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 能特异性识别 UspA1 蛋白的表面暴露区。该多抗的制备为下一步建立卡他莫拉菌快速检测技术奠定了基础。

关键词: 卡他莫拉菌, UspA1 蛋白, 原核表达, 多克隆抗体

Preparation and identification of polyclonal antibodies against *Moraxella catarrhalis* UspA1

Hui Wang, Bo Yang, Kesheng Zhao, Jiaji Li, Xin Li, Mengmeng Kong, Chunjie Gong,
Yi Wang, Ye Tao, Qiu Zhang, and Zheng Hu

Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, School of Food and Biological of Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

Abstract: To prepare polyclonal antibodies (PcAb) against UspA1 of *Moraxella catarrhalis* (Mc), we used bioinformatic analysis to determine the surface exposed region in this protein that holds the antigen epitopes. Then the corresponding coding sequences for this fragment was artificially synthesized according to the codon usage of *Escherichia coli*. The gene fragment was then subcloned into the prokaryotic expression vector pET-28a(+) and expressed in *E. coli rosseta* (DE3), and then the recombinant UspA1-His proteins were purified. Two New Zealand white rabbits were immunized with this protein to prepare antiserum. The resulting PcAb was then purified from the antiserum with Protein A affinity column. The results of

Received: March 8, 2017; **Accepted:** April 19, 2017

Supported by: Hubei Hualong Bio-chemical Pharmaceutical Co., Ltd.

Corresponding author: Zheng Hu. Tel: +86-27-59750497; E-mail: zhenghu@mail.hbut.edu.cn

湖北华龙生物制药有限公司资助。

网络出版时间: 2017-05-03

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170503.1458.003.html>

fluorescence antibody assay, enzyme linked immunosorbent assay and Western blotting analysis showed that the PcAb could specifically recognize the surface exposed region of UspA1 on *Mc*. The preparation of the PcAb laid a foundation of further development of rapid detection technique for *M. catarrhalis*.

Keywords: *Moraxella catarrhalis*, UspA1, prokaryotic expression, polyclonal antibodies

卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*, *Mc*) 由 Kirchner 首次分离于 1890 年, 当时称之为卡他微球菌 *Micrococcus catarrhalis*^[1], 之后又称为卡他奈瑟菌 *Neisseria catarrhalis* 和卡他布兰汉菌 *Branhamella catarrhalis*。最初被认为是对人体无致病性的上呼吸道正常寄居菌, 后来越来越多的研究发现, 该菌不仅可以引起儿童和老年人的上呼吸道感染, 而且还是引起儿童上颌窦炎、中耳炎、肺炎以及成人的慢性下呼吸道感染的最常见致病菌^[2-6]。因多数分离株具有 β -内酰胺类抗生素抗性^[7-16], 所以需要确诊后再选择合适的治疗方案。但临床上该菌与其他呼吸道病原体引起的感染症状类似, 因此常难以根据临床表现、X-射线检查等得出结论, 确诊往往依赖于实验室诊断。由于儿童疾病起病急、转归快的特点, 要求建立基于抗原的敏感、快速、实用的病原体检测方法, 因此寻找制备方法简便、特异性高的针对性抗体具有重要意义。

普遍存在的表面蛋白 (Ubiquitous surface protein A, UspA) 又称为高分子量外膜蛋白, 是 *Mc* 外膜蛋白中研究较成熟的蛋白。1994 年, Helminen 等^[17]发现 *M. catarrhalis* O35E 菌株 UspA 蛋白表面暴露区存在单克隆抗体 (MAb 17C7) 识别位点。此后, 该蛋白被广泛报道。1997 年, Aebi 等^[18]发现 UspA 蛋白包括 2 种蛋白分子, *uspa1* 编码蛋白的 UspA1 (88 kDa) 和 *uspa2* 编码的 UspA2 (62 kDa)。两者均含 MAb 17C7 识别位点, 分别存在相似性达 93% 的氨基酸序列片段 (由 140 个氨基酸组成)。1998 年, Aebi 等^[19]证明 UspA1 蛋白在 *Mc* 黏附到上皮细胞过程中起作用, 而 UspA2 蛋白存在时宿主血清杀菌能力受到限制。Mcmichael 等^[20]报道, UspA1 和 UspA2 为不

同的毒力功能服务, 但都有很好的免疫原性和反应原性。Chen 等^[21]报道抗 UspA1 抗体和抗 UspA2 抗体有交叉反应, 两者都与免疫血清的杀菌活性有关。Lafontaine 等^[22]发现 UspA1 蛋白和由基因 *uspa2H* 编码的 UspA2H 蛋白共同调节 *Mc* 对人上皮细胞的黏附。Meier 等^[23]报道外膜蛋白 UspA1 和 UspA2 在幼儿咽炎分离株中高度保守。Hays 等^[24]认为 UspA1 和 UspA2 可作为疫苗候选抗原。Murphy 等^[25]认为 UspA1 和 UspA2 可作为抗体的靶标。由此可见, UspA1 和 UspA2 具有良好的免疫原性和反应原性, 可用于抗体的制备。

然而, 该蛋白在卡他莫拉菌内表达量较少, 提取天然蛋白后制备抗体存在困难。目前, 国内外未见用 UspA1 重组蛋白制备多克隆抗体的报道。本研究通过对 UspA1 蛋白进行生物信息学分析, 获取了胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段, 并对其密码子进行原核优化后获得了经修饰的 *uspa1* 基因。通过全基因合成和分子克隆技术构建了重组质粒 pET-28a-*uspa1*, 经过诱导表达及纯化获得重组蛋白 UspA1-His, 进一步免疫新西兰大白兔制备了抗 UspA1 蛋白 PcAb, 为进一步建立卡他莫拉菌快速检测技术奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及实验动物

卡他莫拉菌 ATCC 25238 购自 ATCC。克隆宿主菌 *E. coli* Top 10、表达宿主菌 *E. coli* Rosetta (DE3)、表达载体 pET-28a(+)均为本实验室保存。新西兰大白兔由湖北省疾病预防控制中心提供。

1.2 主要试剂

核酸分子量标准、蛋白质分子量标准、彩色

预染蛋白分子量标准、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 小量试剂盒、胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。96 孔板、羊抗兔 IgG-HRP、TMB、硝酸纤维素膜、聚偏二氯乙烯膜 (PVDF) 购自武汉博士德生物工程有限公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。羧基水溶性量子点 (12–18 nm) 购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司。组氨酸亲和预装柱、Protein A 亲和预装柱为 GE healthcare 公司产品。

1.3 *uspa1* 基因克隆与重组表达载体 pET-28a-*uspa1* 的构建

对天然 *Mc* 表面蛋白 UspA1 (GenBank accession number 为 AAF36416) 进行生物信息学分析, 获取其胞外保守结构域中抗原表位最为丰富的肽段 (522–710 aa), 找到其对应的 DNA 编码序列, 引入大肠杆菌偏好性密码子, 优化后在其 5' 引入酶切位点 *Nde* I、3' 端引入终止信号 TAA 和酶切位点 *Xho* I 后化学合成全基因序列 (图 1), 记为 *uspa1* (由南京金斯瑞生物科技有限公司合成后连于载体 pUC57-Sample 上)。将质粒 pUC57-Sample-*uspa1* 和载体 pET-28a(+) 双酶切回

收后进行连接。将连接产物转入 *E. coli Top 10* 感受态细胞中, 用卡那霉素抗性平板和酶切鉴定筛选阳性单克隆进行测序。选择测序未突变且读码框正确的重组原核表达载体 pET-28a-*uspa1*。

1.4 融合蛋白 UspA1-His 的表达、可溶性分析及纯化

将重组载体 pET-28a-*uspa1* 和空载体 pET-28a(+) 分别转入到 *E. coli Rosetta (DE3)* 表达菌中, 挑取单菌落加入到 100 mL 含有硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 220 r/min、37 °C 振荡培养 12 h, 取 1 mL 接入 1 L 含有硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 220 r/min、37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导表达 4 h, 离心收集菌体。菌体经超声裂解后, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清。上清进行亲和层析纯化, 得到重组蛋白。

1.5 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 的制备及纯化

将上述纯化的重组 UspA1-His 融合蛋白稀释后, 按照 200 μ g (1 mL) 与 1 mL 弗氏完全佐剂混匀乳化后免疫 2 只雄性新西兰大白兔, 于背部皮下多点注射。间隔 7 d 后再免疫 1 次, 再过 14 d 后用上述纯化的重组 UspA1-His 融合蛋白按照

```

CATATGATTGCTCAAAACCAAACAGACATCCAAGATCTGG
Nde I
CCGCTTACAACGAGCTACAAGACCAGTATGCTCAAAAGCAAACCGAAGCGATTGACGCTCTAA
ATAAAGCAAGCTCTGCCAATACTGATCGTATTGCTACTGCTGAATTGGGTATCGCTGAGAACA
AAAAAGACGCTCAGATCGCCAAAGCACAAGCCAATGAAAAATAAGACGGCATTCCTAAAAAC
CAAGCTGATATCCAGTTGCACGATAAAAAAATACCAATCTAGGTATCCTTCACAGCATGGTT
GCAAGAGCGGTAGGAAATACACACAAGGTGTTGCTACCAATAAAGCTGACATTGCTAAAAAC
CAAGCAGATATTGCTAATAACATCAAAAAATATCTATGAGCTGGCACAACAGCAAGATCAGCAT
AGCTCTGATATCAAAACCTTTGGCAAAAGTAAAGTGCCTGCCAATACCTGATCGTATTCCTAAAAAC
AAAGCTGAAGCTGATGCAAGTTTGTAAACGCTCACCAAAAAATCAAAATACTTTGATTGAGCAA
GGTGAAGCATTGGTTGAGCAAAATAAAGCCTAACCTCGAG
Xho I

```

图 1 *uspa1* 核苷酸基因全序列

Fig. 1 The whole genome sequence of *uspa1*. The underlined sequences are recognition sites of restriction endonuclease.

200 μg (1 mL) 与 1 mL 弗氏不完全佐剂混匀乳化后进行加强免疫, 加强免疫 7 d 后, 再按上述同样方法再加强免疫一次。7 d 后取血以 UspA1-His 包被酶标板, 间接 ELISA 法测定效价。若效价大于 1×10^5 , 则心脏采血, 分离血清, 否则需再进行加强免疫。以 A 蛋白亲和层析预装柱纯化 PcAb IgG, 用 A_{280} 测定抗体浓度, 并用磷酸盐缓冲液调整为 1 mg/mL, -20°C 保藏备用。

1.6 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 的效价测定

用间接 ELISA 方法测定抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 效价。以 4 $\mu\text{g/mL}$ 的 UspA1-His 包被酶标板 (100 $\mu\text{L/孔}$), 37°C 恒温孵育 1 h, 经洗涤、封闭后, 加入 100 μL 倍比稀释的抗 UspA1-His 融合蛋白 PcA, 初始浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-IgG) 为二抗进行测定。阴性参照以免疫前血清代替一抗。根据 450 nm 处吸光值 (OD_{450}) 判断结果。判定方法, $S/N = (\text{待检 } OD_{450}) / (\text{阴性对照 } OD_{450})$ 。 $S/N > 2.1$ 为阳性。以 $S/N > 2.1$ 所对应的抗体最高稀释倍数作为该抗体的效价。

1.7 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 鉴定

1.7.1 Western blotting 方法鉴定

利用 Western blotting 鉴定抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 对天然 *Mc* 的识别能力。将 *Mc* 超声破胞上清及 UspA1-His 融合蛋白处理后进行 SDS-PAGE 分析。经转膜、干燥、封闭后, 加入待检多抗, 以 HRP-IgG 为二抗进行反应。清洗后, 以超敏 ECL 化学发光即用型底物混合物完全覆盖印迹膜 2–3 min, 超灵敏多功能成像仪下获取胶片。

1.7.2 免疫荧光方法鉴定

利用直接免疫荧光法, 鉴定 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 对 *Mc* 抗原的识别能力。首先用可溶性羧基量子点标记抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb (按说明书操作), 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后紫外光下观察标记效果。再以该标记抗体作为特异性荧光

抗体, 将其滴加于固定有 *Mc* 菌液的载玻片上, 用水洗去多余未参加反应的荧光抗体。干燥后用超分辨荧光显微镜观察 *Mc* 菌体与量子点标记抗体的结合情况。

1.7.3 间接 ELISA 方法鉴定

利用间接 ELISA 法, 测定 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 对 *Mc* 抗原的识别能力。以 *Mc* 菌液 ($OD_{460} = 0.504$) 包被酶标板, 封闭后加入 100 ng/mL 的待检抗体, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-IgG) 为二抗进行测定。阴性参照以待检抗体缓冲液为一抗, 阳性参照包被 UspA1-His 融合蛋白。根据 450 nm 处吸光值 (OD_{450}) 判断结果。判定方法: $S/N = (\text{待检 } OD_{450}) / (\text{阴性对照 } OD_{450})$ 。 $S/N > 2.1$ 为阳性。

2 结果与分析

2.1 *uspa1* 基因克隆与重组表达载体 pET-28a-*uspa1* 的构建

如图 2A 中显示, 通过双酶切方法, 从质粒 pUC57-Sample-*uspa1* 中获得大小为 570 bp 的目的片段, 重组质粒 pET-28a-*uspa1* 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 出现大小与目的片段一致的条带 (图 2B)。基因测序结果正确。

2.2 融合蛋白 UspA1-His 表达与纯化

对含质粒 pET-28a-*uspa1* 的重组菌进行诱导表达, 在 24 kDa 处诱导表达出目的蛋白 (图 3A)。超声裂解后在上清和沉淀中均含有目的蛋白。取诱导表达上清用镍柱进行纯化, 得到纯化的 UspA1-His。以 A_{280} 测定蛋白浓度为 0.4 mg/mL (图 3B)。

2.3 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 的制备及纯化

兔子经 4 次免疫后, 以间接 ELISA 测定血清中抗体的效价可达到 1:512 000 以上, 经 A 蛋白亲和层析纯化后最终可获得 450 mg 的特异性抗体。

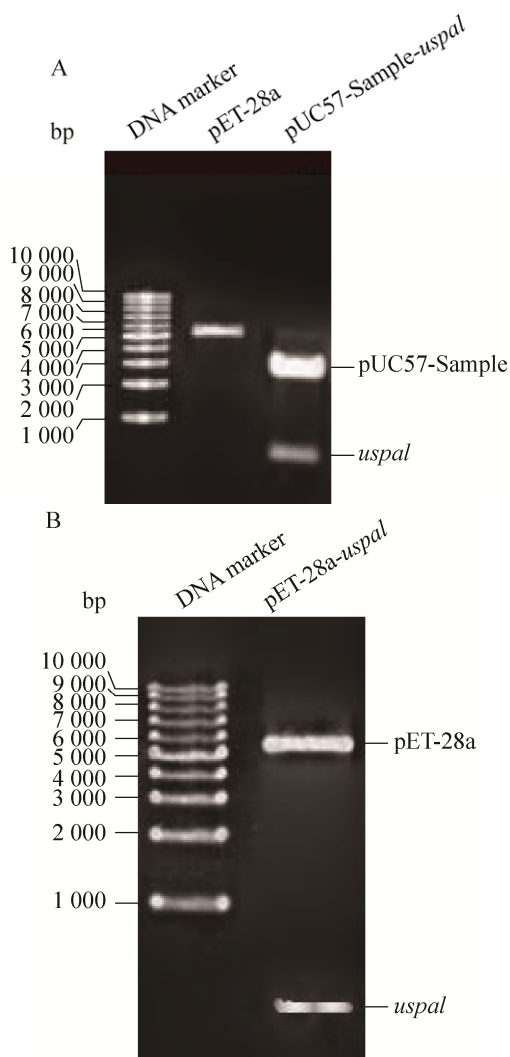


图2 *uspA1* 基因克隆与重组表达载体 pET-28a-*uspA1* 的构建

Fig. 2 Cloning of *uspA1* gene and construction of its recombinant expression vector pET-28a-*uspA1*. (A) Digestion of pET-28a and pUC57-Sample-*uspA1* plasmid with restriction enzyme *Nde* I and *Xho* I. (B) Digestion of pET-28a-*uspA1* plasmid with restriction enzyme *Nde* I and *Xho* I.

2.4 间接 ELISA 测定抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 的效价

抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 的效价测定结果 (图 4) 显示,当用倍比稀释法将待检抗体稀释 512 000 倍时, $S/N=2.69>2.1$, 为阳性结果。若继续稀释, S/N 将小于 2.1, 因此所得抗体的效价为 1:512 000。

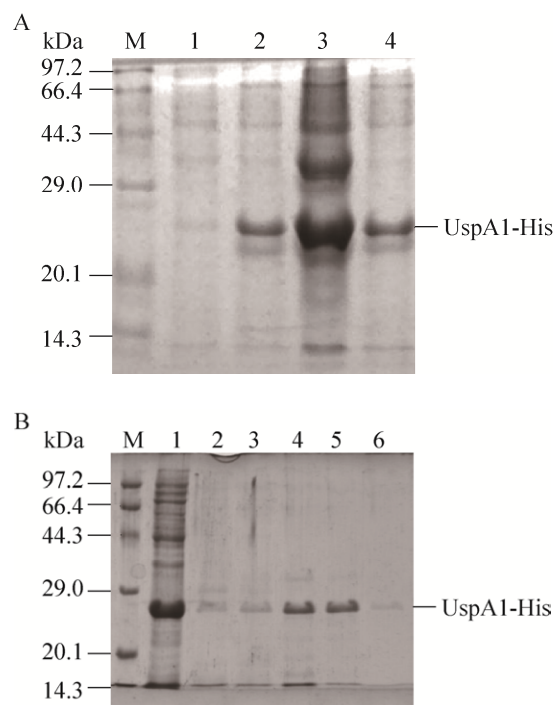


图3 UspA1-His 蛋白的表达与纯化

Fig. 3 Expression and purification of recombinant protein UspA1. (A) Expression of recombinant protein UspA1. M: protein marker; lane 1: UspA1-His before expression; lane 2: UspA1-His after expression; lane 3: supernatant after ultrasonication; lane 4: precipitation after ultrasonication. (B) Purification of recombinant protein UspA1-His. M: protein marker; lane 1: flow-through solution; lane 2: elution buffer with 10 mmol/L glyoxaline; lane 3: elution buffer with 20 mmol/L glyoxaline; lane 4: elution buffer with 40 mmol/L glyoxaline; lane 5: elution buffer with 100 mmol/L glyoxaline; lane 6: elution buffer with 150 mmol/L glyoxaline.

2.5 抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 鉴定

2.5.1 Western blotting 方法鉴定

Western blotting 鉴定抗体结果见图 5, 泳道 1 中出现条带, 表明抗 UspA1-His PcAb 能够识别 UspA1-His 融合蛋白。泳道 2 中 72~95 kDa 之间出现的条带与 UspA1 (88 kDa) 分子量大小相符, 表明抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 能够识别 *Mc* 表面蛋白 UspA1。

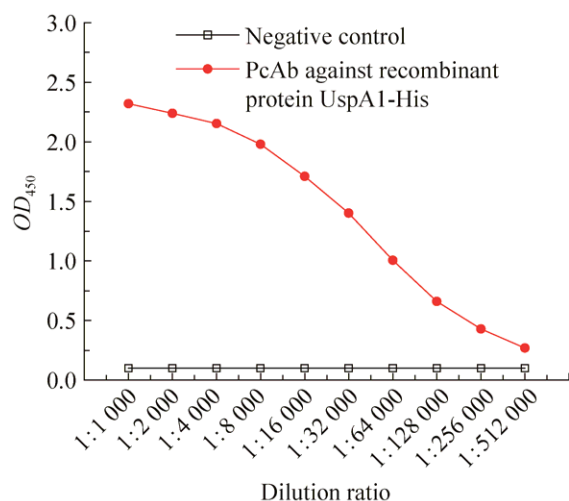


图 4 间接 ELISA 方法检测抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 效价

Fig. 4 The titer assay of the PcAb against recombinant protein UspA1-His.

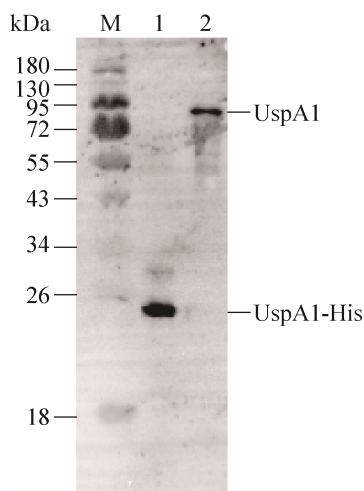


图 5 Western blotting 鉴定抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb

Fig. 5 Identification of the PcAb against recombinant protein UspA1-His by Western blotting. M: protein marker; lane 1: recombinant protein UspA1-His; lane 2: supernatant of *Mc* after ultrasonication.

2.5.2 免疫荧光方法鉴定

用可溶性羧基量子点标记抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb, 1% 琼脂糖凝胶电泳后紫外光下鉴定结果见图 6A。结果显示, 标记了抗体的量子

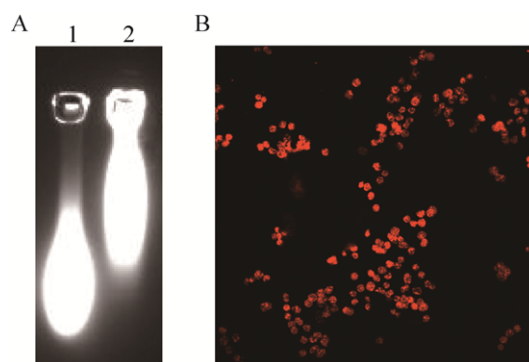


图 6 免疫荧光法鉴定

Fig. 6 Identification by direct immunofluorescence. (A) Detection of the labelled PcAb. Lane 1: the unlabelled PcAb; lane 2: the labelled PcAb. (B) The labelled PcAb's recognition to *Mc*.

点比未标记抗体的量子点分子量大, 说明抗体标记成功。量子点标记抗体与 *Mc* 菌体反应后, 超分辨荧光显微镜下观察结果见图 6B。结果显示, 视野中可观察到红色亮点, 说明量子点标记 PcAb 能够识别 *Mc* 表面蛋白 UspA1 的胞外暴露区。

2.5.3 间接 ELISA 方法鉴定

间接 ELISA 法鉴定抗体结果显示, $S/N=46.701>2.1$, 结果为阳性, 说明待检抗 UspA1-His 融合蛋白 PcAb 能有效识别 *Mc* 表面蛋白 UspA1 的胞外暴露区。该结果与 2.5.2 中免疫荧光鉴定结果一致。

3 讨论

本研究对卡他莫拉菌 UspA1 蛋白进行生物信息学分析, 获取了其胞外保守结构域中抗原表位最为丰富的肽段 (522–710 aa), 避免了多余肽段的无效表达, 提高了重组抗原的有效性。密码子优化协调是进行蛋白质异源系统表达常用的手段。本文对 *uspA1* 基因进行原核密码子优化后, 获得了可溶性表达的目的蛋白。重组表达的小分子蛋白免疫原性强, 免疫后所得多克隆抗体量大、亲和力高。本文用 800 μ g 表达的重组蛋白 UspA1-

His 免疫新西兰兔 经 4 次免疫后得到总量 450 mg 的多克隆抗体, 效价可达 1:512 000。

Ackermann 等^[26]研究发现 UspA1 作为 Oca 家族成员, 其保守功能域(742–832 aa)与 YadA、EibA、Hia 等多个蛋白的相关结构域在三维结构上高度相似, 但氨基酸序列一致性很低(最高为 10.99%), 因此本文依据该保守结构域及其附近区域(522–710 aa)制备的多克隆抗体可保证其特异性。

本研究所制备的抗卡他莫拉菌表面蛋白 UspA1 胞外结构域的多克隆抗体不仅能识别 UspA1-His 重组蛋白, 而且可识别 Mc 表面蛋白 UspA1 的胞外暴露区。该研究为进一步建立基于抗原的卡他莫拉菌快速检测方法奠定了基础。

目前, 正在利用该表面暴露区制备相应的单克隆抗体。单克隆抗体制备完成后将与该多克隆抗体进行配对, 制备基于量子点免疫层析的检测试剂盒。

REFERENCES

- [1] Arkwright JA. On the occurrence of the *Micrococcus catarrhalis* in normal and catarrhal noses and its differentiation from other gram-negative cocci. J Hyg, 1907, 7(1): 145–154.
- [2] Leinonen M, Luotonen J, Herva E, et al. Preliminary serologic evidence for a pathogenic role of *Branhamella catarrhalis*. J Infect Dis, 1981, 144(6): 570–574.
- [3] Wald ER, Milmoie GJ, Bowen A, et al. Acute maxillary sinusitis in children. N Engl J Med, 1981, 304(13): 749–754.
- [4] Nicotra B, Rivera M, Luman JJ, et al. *Branhamella catarrhalis* as a lower respiratory tract pathogen in patients with chronic lung disease. Arch Intern Med, 1986, 146(5): 890–893.
- [5] van Hare GF, Shurin PA, Marchant CD, et al. Acute otitis media caused by *Branhamella catarrhalis*: biology and therapy. Clin Infect Dis, 1987, 9(1): 16–27.
- [6] Wright PW, Wallace RJ Jr, Shepherd R. A descriptive study of 42 cases of *Branhamella catarrhalis* pneumonia. Am J Med, 1990, 88(5Suppl.1): S2–S8.
- [7] Shurin PA, Marchant CD, Kim CH, et al. Emergence of beta-lactamase-producing strains of *Branhamella catarrhalis* as important agents of acute otitis media. Pediatr Infect Dis, 1983, 2(1): 34–38.
- [8] Wallace JR, Nash DR, Steingrube VA. Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Am J Med, 1990, 88(5 Suppl.1): S46–S50.
- [9] Kovatch AL, Wald ER, Michaels RH. β -lactamase-producing *Branhamella catarrhalis* causing otitis media in children. J Pediatr, 1983, 102(2): 261–264.
- [10] Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, et al. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* respiratory tract isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(6): 1875–1881.
- [11] Luo R, Huang Y, Liu L, et al. Clinical features and drug resistance of *Moraxella catarrhalis* in children with lower respiratory infections in Chongqing. Acta Acad Med Mil Tert, 2007, 29(18): 1818–1820 (in Chinese).
罗蓉, 黄英, 刘岚, 等. 小儿下呼吸道感染中卡他莫拉菌的分离特点与耐药性分析. 第三军医大学学报, 2007, 29(18): 1818–1820.
- [12] Abdullah FE, Ahuja KR, Kumar H. Prevalence and emerging resistance of *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract infections in Karachi. J Pak Med Assoc, 2013, 63(11): 1342–1344.
- [13] Elrhman EMA, Ibrahim AH, Abdelhalim KA. Frequency of *Moraxella catarrhalis* from patients with lower respiratory tract infection in Khartoum State, Sudan. World Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 4(5): 2286–2293.
- [14] Liu J, Le CY, Wang XD, et al. Drug resistance of *Moraxella catarrhalis* causing lower respiratory tract infection in patients of traditional Chinese medicine hospital. Chin J Nosocomiol, 2014, 24(22): 5506–5507 (in Chinese).
刘军, 乐朝阳, 王炫德, 等. 中医院患者下呼吸道感染卡他莫拉菌耐药性分析. 中华医院感染学杂志,

- 2014, 24(22): 5506–5507.
- [15] Huang LY, Li DM, Hu XH, et al. Distribution and drug resistance of fastidious bacteria of children with respiratory tract infection in Nanning Area. *J Pediatr Pharm*, 2016, 22(1): 46–48 (in Chinese).
黄丽英, 李东明, 胡雪桦, 等. 南宁地区儿童呼吸道感染苛养菌分布及耐药性分析. *儿科药学杂志*, 2016, 22(1): 46–48.
- [16] Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among 723 outpatient clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1994 and 1995: results of a 30-center national surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(12): 2884–2886.
- [17] Helminen ME, Maciver I, Latimer JL, et al. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J Infect Dis*, 1994, 170(4): 867–872.
- [18] Aebi C, Maciver I, Latimer J L, et al. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect Immun*, 1997, 65(11): 4367–4377.
- [19] Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun*, 1998, 66(7): 3113–3119.
- [20] Mcmichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun*, 1998, 66(9): 4374–4381.
- [21] Chen DX, Barniak V, van der Meid KR, et al. The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 and UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in adults and children. *Infect Immun*, 1999, 67(3): 1310–1316.
- [22] Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, et al. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells *in vitro*. *J Bacteriol*, 2000, 182(5): 1364–1373.
- [23] Meier PS, Troller R, Grivea IN, et al. The outer membrane proteins UspA1 and UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children. *Vaccine*, 2002, 20(13/14): 1754–1760.
- [24] Hays JP, van der Schee C, Loogman A, et al. Total genome polymorphism and low frequency of intra-genomic variation in the *uspA1* and *uspA2* genes of *Moraxella catarrhalis* in otitis prone and non-prone children up to 2 years of age: Consequences for vaccine design? *Vaccine*, 2003, 21(11/12): 1118–1124.
- [25] Murphy TF, Brauer AL, Aebi C, et al. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun*, 2005, 73(6): 3471–3478.
- [26] Ackermann N, Tiller M, Anding G, et al. Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 2008, 190(14): 5031–5043.

(本文责编 陈宏宇)